

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

04 July 2000 (04.07.00)

International application No.

PCT/JP99/07079

Applicant's or agent's file reference

B-528SMOP924

International filing date (day/month/year)

16 December 1999 (16.12.99)

Priority date (day/month/year)

18 December 1998 (18.12.98)

Applicant

KANNO, Sohei et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

25 May 2000 (25.05.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

R. Forax

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

09/868338

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

TOYAMA, Tsutomu  
Yokoyama Building 6th Floor  
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-0004  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 January 2000 (13.01.00)	
Applicant's or agent's file reference B-528SMOP924	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/07079	International filing date (day/month/year) 16 December 1999 (16.12.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 18 December 1998 (18.12.98)
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
18 Dec 1998 (18.12.98)	10/360621	JP	04 Janu 2000 (04.01.00)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Shinji IGARASHI

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu\_  
Yokoyama Building 6th Floor  
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-0004  
JAPONDate of mailing (day/month/year)  
29 June 2000 (29.06.00)Applicant's or agent's file reference  
B-528SMOP924

## IMPORTANT NOTICE

International application No.  
PCT/JP99/07079International filing date (day/month/year)  
16 December 1999 (16.12.99)Priority date (day/month/year)  
18 December 1998 (18.12.98)Applicant  
AJINOMOTO CO., INC. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,CN,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AP,BA,BB,BG,BR,CA,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,LC,LK,LR,LT,  
LV,MA,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,SG,SI,SK,TR,TT,UA,UZ,VN,YU,ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 29 June 2000 (29.06.00) under No. WO 00/37647

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

J. Zahra

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38

DOCKET NO.: 209861US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Sohei KANNO, et al

SERIAL NUMBER: NEW U.S. PCT APPLICATION (based on PCT/JP99/07079)

FILED: HERewith

FOR: ABC TRANSPORTER AND GENE CODING FOR THE SAME

**REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS**  
**CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Attorney of Record  
Registration No. 34,423



**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07079

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nucleic Acids Research, Vol.22, No.24, (1996), Ralf Himmelreich, et al. "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae", p.4420-4449, especially, see p.4428-29 and p.45-47	1-14
A	Archives of Microbiology, Vol.165, No. 5, (1996), Norbert Peekhaus et al. "The gluEMP operon from Zymomonas mobilis encodes a high-affinity glutamate carrier with similarity to binding-protein-dependent transport systems", p.325-332	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January, 2000 (19.01.00)

Date of mailing of the international search report

01 February, 2000 (01.02.00)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Sohei KANNO, et al

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP99/07079

INTERNATIONAL FILING DATE: 16 December 1999

FOR: ABC TRANSPORTER AND GENE CODING FOR THE SAME

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO.</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
JAPAN	10/360621	18 December 1998

A certified copy of the corresponding Convention application(s) was submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP99/07079**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



**22850**

REV  
15T

09/868338

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 28 JAN 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 B-528SMOP924	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/07079	国際出願日 (日.月.年) 16.12.99	優先日 (日.月.年) 18.12.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345		
出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.05.00	国際予備審査報告を作成した日 10.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 北村 弘樹	4B 2936
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-14

請求の範囲1-14に記載された発明は、国際調査報告に記載された何れの文献に対しても、新規性及び進歩性を有する。

特に、請求の範囲1-14に記載された特定のアミノ酸配列を有するABCトランスポーターを構成するタンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子は何れの文献にも記載されていない。また、そのようなタンパク質及び遺伝子を取得することが容易であるとも認められない。

EP US

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 B-528SMOP924	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/07079	国際出願日 (日.月.年) 16.12.99	優先日 (日.月.年) 18.12.98
出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq  
BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nucleic Acids Research, 第22巻, 第24号, (1996), Ralf Himmelreich, et al. "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ", p. 4420-4449 特に p. 4428-29, 45-47参照	1-14
A	Archives of Microbiology, 第165巻, 第5号, (1996), Norbert Peekhaus et al. "The <i>gluEMP</i> operon from <i>Zymomonas mobilis</i> encodes a high-affinity glutamate carrier with similarity to binding-protein-dependent transport systems", p. 325-332	1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 01. 00

国際調査報告の発送日

01.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07079

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nucleic Acids Research, Vol.22, No.24, (1996), Ralf Himmelreich, et al. "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae", p.4420-4449, especially, see p.4428-29 and p.45-47	1-14
A	Archives of Microbiology, Vol.165, No. 5, (1996), Norbert Peekhaus et al. "The gluEMP operon from Zymomonas mobilis encodes a high-affinity glutamate carrier with similarity to binding-protein-dependent transport systems", p.325-332	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
19 January, 2000 (19.01.00)Date of mailing of the international search report  
01 February, 2000 (01.02.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Translation of Category of Cited Documents in attached International Search Report:

- A: Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular reference
  - E: Earlier document published on or after the international filing date
  - L: Document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
  - O: Document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
  - P: Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
  - T: Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
  - X: Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
  - Y: Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
  - &: Document member of the same patent family
-



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/31, 15/55, 9/16, C07K 14/345</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/37647</p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月29日(29.06.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/07079</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月16日(16.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/360621 1998年12月18日(18.12.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 菅野壮平(KANNO, Sohei)(JP/JP) 木村英一郎(KIMURA, Eiichiro)(JP/JP) 松井和彦(MATSUI, Kazuhiko)(JP/JP) 中松 亘(NAKAMATSU, Tsuyoshi)(JP/JP) 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: ABC TRANSPORTER AND GENES ENCODING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 ABCトランスポーター及びそれをコードする遺伝子</p> <p>(57) Abstract ABC transporter constituents of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 8, 9 and 10; and DNAs encoding the same. These DNAs are usable in breeding corynebacteria.</p>		

(57)要約

本発明は、配列表の配列番号 8、9 もしくは 1.0 に記載のアミノ酸配列を有するプレバクテリウム・ラクトファーメンタムのABCトランスポーターの構成成分、及びそれらをコードするDNAを提供する。本発明のDNAは、コリネ型細菌の育種に利用することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ		TT トリニダッド・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヲトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

## A B Cトランスポーター及びそれをコードする遺伝子

## 技術分野

本発明は、新規なA B Cトランスポーター及びその構成成分であるタンパク質をコードする遺伝子に関する。該遺伝子は、アミノ酸の細胞膜輸送が改変された微生物の育種等に利用することができる。

## 背景技術

アミノ酸やイオン等の物質が細胞膜を透過するための機構としていくつか知られているが、その一つとしてA T P結合カセット (ATP binding cassette) スーパーファミリー (A B Cトランスポーター) が知られている (C. F. Higgins, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 8, 67 (1992))。

A T P結合カセットは、膜貫通ドメインを含むA T P結合ドメインを有する一群のタンパク質であり、その生理的機能は主として物質の細胞内への取り込みであるが、物質の排出にもある程度関与していると考えられている。細菌では多くの場合、膜タンパク質 (膜成分)、膜の内側にありA T P ~~a~~ s e活性を有するタンパク質、及び膜の外側にあり輸送される物質に結合する結合タンパク質を構成成分として含んでおり、膜タンパク質とA T P a s e活性を有するタンパク質は多量体複合体を形成している。尚、物質の排出システムは、輸送される物質に結合する結合タンパク質を欠いているといわれている (Reizer, J. et al., *Prot. Sci.* 1, 1326 (1992))。

A B Cトランスポーター又はその構成成分は物質の輸送に関与しているため、これらの遺伝子の発現を改変することによって、細胞の物質輸送に関する特性を改変させることができると考えられる。

エシェリヒア・コリ等の細菌では種々のA B Cトランスポーター遺伝子の構造が解析され、A B Cトランスポーターの構成成分をコードする各遺伝子は、オペロンを形成していることが知られている。しかし、コリネ型細菌ではアミノ酸の



膜輸送に関するABCトランスポーターやその構成成分をコードする遺伝子は未知のものが多い。

### 発明の開示

本発明者は、コリネ型L-グルタミン酸生産菌の育種を目的として、L-グルタミン酸生合成経路のうちの一つに関与する酵素グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（グルタミン酸シンターゼとも呼ばれる。以下「GOGAT」と略す）をコードする遺伝子をクローニングした。その過程において、GOGATをコードする遺伝子（*gltBD*）を含むDNA断片が、アミノ酸の輸送に関わると考えられるABCトランスポーターをコードする遺伝子を含むことを偶然見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、ABCトランスポーターの構成成分であるタンパク質、及びそれらをコードするDNAである。

本発明のABCトランスポーターの第1の構成成分は、下記（A）又は（B）に示すタンパク質である。

（A）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列表の配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

本発明のABCトランスポーターの第2の構成成分は、下記（C）又は（D）に示すタンパク質である。

（C）配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（D）配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

本発明のABCトランスポーターの第3の構成成分は、下記（E）又は（F）に示すタンパク質である。

（E）配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（F）配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個の

アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

本発明はまた、上記ABCトランスポーターの各構成成分であるタンパク質をコードするDNAを提供する。

さらに本発明は、ABCトランスポーターをコードするオペロンを提供する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のDNAは、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムから *gltBD* 遺伝子の近傍に存在するORFとして見い出されたものであり、次のようにして取得することができる。

ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム、例えばブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869の染色体DNAを鋳型とし、エシェリヒア・コリK-12 (Gene、第60巻、1~11頁、1987年) 及び酵母 (サッカロマイセス・セレビシエ、GenBank accession No.X89221) の *gltBD* 遺伝子間で相同性の高い領域の塩基配列、例えば配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するプライマー及び配列表の配列番号2に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) により、約1.4 kbのDNA断片を取得する。ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869は、ATCC (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection): アメリカ合衆国、メリーランド 20852、ロックビル、パークローンドライブ 10301) から入手することができる。

次に、上記のようにして得られるPCR増幅断片をプローブとし、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869の染色体DNAライブラリーのコロニーハイブリダイゼーションを行い、前記プローブにハイブリダイズするDNA断片を取得することにより、*gltBD* 遺伝子とともに本発明のDNAを取得することができる。染色体DNAライブラリーの調製に、HindIIIで切断した染色体DNAを用いると、上記DNA断片は約1.4 kbの大きさを持つ断片として得ることができる。

上記のDNA断片には *gltBD* 遺伝子が含まれ、その下流には、末端から *g*

1 t B D 遺伝子と逆向きに 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) が存在する。これらの ORF は、配列番号 7 に示す塩基配列に含まれる ORF のうち、2 番目及び 3 番目の ORF にそれぞれ相当する。

後記実施例に示すように、上記 2 つの ORF は、これらの上流に存在する他の一つの ORF とともに、オペロンを形成している可能性がある。この ORF は、配列番号 7 に示す塩基配列に含まれる ORF のうち 1 番目の ORF に相当する。この 1 番目の ORF は、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム、例えばプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型とし、配列表の配列番号 5 に示す塩基配列を有するプライマー及び配列表の配列番号 6 に示す塩基配列を有するプライマーを用いた PCR により、約 1.8 kb の DNA 断片として取得することができる。この DNA 断片には、目的とする ORF の上流に、プロモーター領域と推定される領域が存在する。

配列番号 7 に示した塩基配列は、上記の約 1.4 kb の DNA 断片中の塩基配列 (1.3 kb) と、約 1.8 kb の DNA 断片中の塩基配列 (1.1 kb) を連結したものである。

上記の各 ORF は、その塩基配列及び隣接する領域の塩基配列が明らかになったので、それらの塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いた PCR によっても、取得することができる。

染色体 DNA の調製、染色体 DNA ライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミド DNA の調製、DNA の切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989) 等に記載されている。

上記の第二の ORF 及びそれによってコードされるアミノ酸配列について、既知の配列と相同性比較を行った。用いたデータベースは、EMBL および SWISS-PROT である。その結果、これらの配列は、表 1 に示す既に報告されているアミノ酸の輸送を司る ABC トランスポーターを構成する ATPase タンパク質及びそれをコードする遺伝子と相同性が認められた。これを含む 3 つの ORF はオペロン

を形成している可能性がある。

表 1

遺伝子	輸送物質	由来	文献	相同性
artP	アルギニン	E. coli	J. Bacteriol. 175:3687-3688 (1993)	31.0%
artP	アルギニン	Haemophilus influenzae	Science 269:496-512(1995)	31.8%
glnQ	グルタミン	Bacillus stearothermophilus	J. Bacteriol. 173:4877-4888 (1991)	35.4%
glnQ	グルタミン	E. coli	Mol. Gen. Genet. 205:260-269 (1986)	33.5%
gltL	グルタミン酸/ アスパラギン酸	E. coli	GeneBank Accession No. U10981	33.5%
gltL	グルタミン酸/ アスパラギン酸	Haemophilus influenzae	Science 262:496-512(1995)	31.2%
gluA	グルタミン酸	Corynebacterium glutamicum	J. Bacteriol. 177:1152-1158	34.4%
hisP	ヒスチジン	E. coli	Nature 298:723-727(1982)	33.0%
hisP	ヒスチジン	Salmonella typhimurium	Nucleic acids Res. 15: 8568-8568	34.4%

本発明のABCトランスポーターの構成成分をコードする遺伝子は、コードされる各タンパク質の特性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むATP結合タン

パク質をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。

上記のようなABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、各タンパク質をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び各々のタンパク質をコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、各構成成分を保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物の性質を調べることにより、ABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有する各タンパク質をコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、各構成成分をコードする塩基配列又は同塩基配列から調製されるプローブ、例えば、ATPaseにあつては、配列番号7の塩基番号1117~1725からなる塩基配列又は同塩基配列から調製されるプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、各構成成分の特性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによつても、ABCトランスポーターの構成成分と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件を

いう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば40%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターを用いて発現産物の特性を調べることであり、容易に取り除くことができる。

本発明のABCトランスポーターの構成成分をコードするDNA及びABCトランスポーターのオペロン（以下、これらを単に「本発明の遺伝子」ということがある）は、コリネ型細菌の育種に利用することができる。すなわち、本発明のABCトランスポーター又はその構成成分は、アミノ酸の輸送に関与していると考えられるため、これらの遺伝子の発現を改変することによって、細胞のアミノ酸輸送に関する特性を改変させることができると考えられる。

本発明を適用し得るコリネ型細菌は、従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

コリネバクテリウム・ハーキュリス  
ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)  
ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)  
ブレビバクテリウム・インマリオフィラム  
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・ロゼウム  
ブレビバクテリウム・サッカロリティカム  
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス  
ブレビバクテリウム・アルバム  
ブレビバクテリウム・セリヌム  
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870  
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806  
コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC 21511  
コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991  
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13020、13032、13060  
コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 15990  
コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC 17965  
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ 12340 (FERM BP-1539)  
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868  
ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 14020  
ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 13826、ATCC 14067

---

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13665、ATCC13869、

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレビバクテリウム・サッカロリディカム ATCC14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

ブレビバクテリウム・アルバム ATCC15111

ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354

ABCトランスポーター又はその構成成分をコードする遺伝子を改変する方法としては、これらの遺伝子の増幅又は破壊が挙げられる。遺伝子等の増幅は、遺伝子をプラスミド等のベクターに連結して得られる組換えベクターでコリネ型細菌を形質転換することによって行うことができる。その際、マルチコピー型のベクターを用いることによって、増幅の効率を高めることができる。そのようなベクターとしては、コリネ型細菌で自律複製出来るプラスミド、例えば以下のものが挙げられる。

pAM 330 特開昭58-67699号公報参照

pHM 1519 特開昭58-77895号公報参照

pAJ 655 特開昭58-192900号公報参照

pAJ 611 同 上

pAJ 1844 同 上

pCG 1 特開昭57-134500号公報参照

pCG 2 特開昭58-35197号公報参照

pCG 4 特開昭57-183799号公報参照

pCG 11 同 上

コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) により行うことができる。

遺伝子の増幅は、本発明の遺伝子を上記宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネ型細菌の染色体DNA上に目的とする



遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985))。また、染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レベッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

また、染色体上にもともと存在する遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なもの又は機能の弱いものに置換することによっても、該遺伝子の発現を改変させることができる。

一方、遺伝子の破壊は、相同組換えによる遺伝子破壊法が既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性プラスミドを用いる方法などによって、行うことができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

##### (1) プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869のgl t BD遺伝子のクローニング

大腸菌と酵母のgl t B遺伝子産物間でアミノ酸配列の相同性の高い領域を選び、その配列から塩基配列を推定し、配列番号1および配列番号2に示すオリゴヌクレオチドを合成した。一方、Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies Corp.製) を用いて、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAを調製した。この染色体DNAを鋳型とし、前記オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、PCRテクノロジー (ヘンリーエーリッヒ編、ストックトンプレス、1989年) 8頁に記載されている標準反応条件でPCRを行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動したところ、約1.4キロベースのDNA断片が増幅されていることが判明し

た。

得られたDNAは、配列番号1および配列番号2に示すオリゴヌクレオチドを用いて両端の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems社製)を用いてSangerの方法(J. Mol. Biol., 143, 161 (1980))に従って行った。決定された塩基配列をアミノ酸配列に翻訳して、大腸菌と酵母のgltB遺伝子から予想されるアミノ酸配列と比較したところ、相溶性が高かったので、PCRにより増幅したDNA断片はブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869のgltB遺伝子の一部であると判断した。このPCR増幅DNA断片をプローブとし、上記の方法で調製したブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869の染色体DNAを定法によりEcoRI、BamHI、HindIII、PstI、SalI (宝酒造社製)で切断した断片について、DIG DNA Labeling and Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、HindIIIで切断された約14キロベースの切断断片がプローブDNAとハイブリダイズすることが判明した。

そこで、定法により調製したブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869染色体DNAのHindIII断片をアガロース電気泳動し、約10キロベース以上のDNA断片をガラスパウダーを用いて回収し、回収されたDNA断片と制限酵素HindIII (宝酒造社製)で切断したベクターpMW219 (ニッポンジーン製)はライゲーションキット (宝酒造社製)を用いて連結し、エシェリヒア・コリJM 109のコンピテントセル (宝酒造社製)を用いて形質転換を行った。形質転換株をIPTG (イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド)  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、X-Gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド)  $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカナマイシン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むL培地 (バクトトリプトン $10\text{g}/\text{l}$ 、バクティーストエキストラクト $5\text{g}/\text{l}$ 、NaCl $5\text{g}/\text{l}$ 、寒天 $15\text{g}/\text{l}$ 、pH7.2)に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、約1,000個の形質転換体を得た。

得られた形質転換体は、アルカリ法 (生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年)を用いてプラスミドを調製した。プローブとして用いたDNA配列の中で塩基配列が決定している部分をもとに作製した配列番号3お

よび配列番号4に示す塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、上記プラスミドを鋳型として上記の条件でPCRを行い、このプライマーを用いてブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869の染色体を鋳型としてPCRを行った時に増幅されるDNA断片と同じ約1.3キロベースの大きさの増幅断片が得られるプラスミドを保持する形質転換体を選択した。

(2) ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869 *gltBD* 遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列の決定及びABCトランスポーター遺伝子の単離

上記(1)により得られた形質転換体からアルカリ法により調製したプラスミドDNAは、ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体由来の約14キロベースのDNA断片を含んでいた。上記の方法と同様にして、得られたプラスミドのブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体由来の約14キロベースのDNA断片の全塩基配列決定を行った。その結果、得られたDNA断片中には、*gltBD* 遺伝子の全長が含まれていたが、500bp以上のオープン・リーディング・フレームが*gltBD* 遺伝子の下流に末端から逆向きに2個存在し、これらのオープン・リーディング・フレームの下流にはターミネーターと推定される配列も存在することが明らかとなった。ただし、このオープン・リーディング・フレームは、プロモーター領域が欠けていたので、この上流部分を、下記のようにしてクローニングを行った。

ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869染色体を制限酵素BamHIで消化したDNA断片から、配列表配列番号5および配列番号6に示したプライマーを使い、LA PCR in vitro cloning Kit (宝酒造製)を用いてクローニングを行った。上記プライマーを用いてPCRを行った結果、約1.8キロベースのDNA断片が増幅されたので、このDNA断片を上記と同様の方法での塩基配列の決定を行った。その結果、増幅されたDNA断片には、上記の2つのオープン・リーディング・フレームの上流に位置する、約350アミノ酸のオープン・リーディング・フレームが含まれており、さらにその上流にはプロモーター領域と推定される領域が存在することも明らかとなった。したがって、この3つのオープン・リーディング・フレームは、オペロンである可能性がある。

これらのオープン・リーディング・フレームの塩基配列は、配列表配列番号 7 に示す通りである。配列表配列番号 7 の配列には、その塩基配列から推定される産物のアミノ酸配列も示した。このうち、塩基番号 1～1101 が 1 番目のオープン・リーディング・フレームで、1117～1725 が 2 番目のオープン・リーディング・フレームで、さらに 1759～2367 が 3 番目のオープン・リーディング・フレームである。なお、それぞれのオープン・リーディング・フレームによりコードされるタンパク質の N 末端にあるメチオニン残基は開始コドンである ATG に由来するため、タンパク質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記の各タンパク質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。また、ここで推定されたプロモーター領域やターミネーター配列は、あくまでもコンピューターを使った解析の結果であるので、実際にはこの上流もしくは下流にオープン・リーディング・フレームが存在し、それらも一緒に発現している可能性もある。

塩基配列、アミノ酸配列のおおのについて既知の配列と相同性比較を行った。用いたデータベースは、EMBL および SWISS-PROT である。その結果、配列表配列番号 7 に示される DNA およびそれにコードされる各タンパク質は、コリネバクテリウム属細菌では新規の遺伝子及びタンパク質であることが明らかとなった。このうち 2 番目のオープン・リーディング・フレームおよびそれにコードされるタンパク質は、すでに報告されている ABC トランスポーターの ATP 結合タンパク質及びそれをコードする遺伝子と相同性が高く、コリネバクテリウム属細菌では新規な ATP 結合タンパク質をコードする遺伝子であることが判明した。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタムの ABC トランスポーターの構成成分、及びそれらをコードする DNA が提供される。本発明の遺伝子は、コリネ型細菌の育種に利用することができる。

## 請求の範囲

## 1. 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

## 2. 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

## 3. 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 2 記載の DNA。

(a) 配列表の配列番号 7 の塩基番号 1 ~ 1101 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 7 の塩基番号 1 ~ 1101 からなる塩基配列又は同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質をコードする DNA。

4. 前記ストリンジェントな条件が、 $1 \times \text{SSC}$  及び  $0.1\% \text{SDS}$  に相当する塩濃度で  $60^\circ\text{C}$  で洗浄が行われる条件である請求項 3 記載の DNA。

## 5. 下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、ABCトランスポーターの ATPase 活性を有するタンパク質。

## 6. 下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質。

7. 下記(c)又は(d)に示すDNAである請求項6記載のDNA。

(c) 配列表の配列番号7の塩基番号1117～1725からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列表の配列番号7の塩基番号1117～1725からなる塩基配列又は同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターのATPase活性を有するタンパク質をコードするDNA。

8. 前記ストリンジェントな条件が、 $1\times$ SSC及び0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である請求項7記載のDNA。

9. 下記(E)又は(F)に示すタンパク質。

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

10. 下記(E)又は(F)に示すタンパク質をコードするDNA。

(E) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質。

11. 下記(e)又は(f)に示すDNAである請求項10記載のDNA。

(e) 配列表の配列番号7の塩基番号1759～2367からなる塩基配列を含むDNA。

(f) 配列表の配列番号7の塩基番号1759～2367からなる塩基配列又は同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ABCトランスポーターを構成するタンパク質をコードするDNA。

12. 前記ストリンジェントな条件が、 $1 \times \text{SSC}$ 及び0.1% SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である請求項11記載のDNA。

13. 配列番号8記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列と、配列番号9記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列と、配列番号10記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列とを含むDNA。

14. 配列番号7記載の塩基配列を有する請求項13記載のDNA。

## 配列表

## Sequence Listing

<110> 味の素株式会社(Ajinomoto Co., Inc.)

<120> A B C トランスポーター及びそれをコードする遺伝子

<130> B-528SMOP924

<141> 1999-12-16

<150> JP 10-360621

<151> 1998-12-18

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<221> UNSURE

<222> (3,9,12)

<223> n=a or c or g or t

<220>



2/14

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 1

ggngarggng gngarga

17

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (1,4,7,)

<223> n=a or c or g or t

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 2

nccncngtc atrtaytc

18

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 3

aatccacgtg aagctagtgg cagaacaagg cg

32

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying Brevibacterium lactofermentum gltBD gene

<400> 4

acgaatgaac aattcaccac tggttgcgcc

30

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying downstream region of gltBD gene

<400> 5

atcctcgaca aggatctgtc cg

22

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying downstream region of gltBD gene

<400> 6

ggtttgtcaa gtgtgccaag acagttgagc

30

<210> 7

<211> 2370

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1101)

<220>

<221> CDS

<222> (1117)..(1725)

<220>

<221> CDS

<222> (1759)..(2367)

&lt;400&gt; 7

atg ctg gcg acc cga cta att acc ttg ttc ttt ttc cta gga atc att	48
Met Leu Ala Thr Arg Leu Ile Thr Leu Phe Phe Phe Leu Gly Ile Ile	
1 5 10 15	
gga tcg cta acc ggt aac ctc agt gaa cta cgt gca caa act act ttt	96
Gly Ser Leu Thr Gly Asn Leu Ser Glu Leu Arg Ala Gln Thr Thr Phe	
20 25 30	
agt aca tta tgg gat acc cat aaa gaa acc tat aga gtc tcc ata gct	144
Ser Thr Leu Trp Asp Thr His Lys Glu Thr Tyr Arg Val Ser Ile Ala	
35 40 45	
tcc gca gca gga caa gac ttc tac ggg ctt gct gag act cta cgc act	192
Ser Ala Ala Gly Gln Asp Phe Tyr Gly Leu Ala Glu Thr Leu Arg Thr	
50 55 60	
atg gat agg cat ggg gaa att att ttg gca gat cgt caa tgg tta aca	240
Met Asp Arg His Gly Glu Ile Ile Leu Ala Asp Arg Gln Trp Leu Thr	
65 70 75 80	
gct ccc ctt gat atc ggt gca cca gtc gta tta tca aac aca act ttt	288
Ala Pro Leu Asp Ile Gly Ala Pro Val Val Leu Ser Asn Thr Thr Phe	
85 90 95	
gcc gtt gat gaa gga cta ctt gcg cca aaa gat cta ccg caa agt gac	336
Ala Val Asp Glu Gly Leu Leu Ala Pro Lys Asp Leu Pro Gln Ser Asp	
100 105 110	
<del>gag atc aca ata ttg cat cct cag ttt ctg gat tcg gcc aaa gag cca</del>	<del>384</del>
<del>Glu Ile Thr Ile Leu His Pro Gln Phe Leu Asp Ser Ala Lys Glu Pro</del>	
<del>115 120 125</del>	
gaa tta ctt ggt ttg ctg gag ttc gaa gca tcc aac tca caa gtg cca	432
Glu Leu Leu Gly Leu Leu Glu Phe Glu Ala Ser Asn Ser Gln Val Pro	
130 135 140	



7/14

290	295	300	
cgc ttc aat tcc gtg cgt ctg gct cgc gaa ccg cta ttt cga gcg atc			960
Arg Phe Asn Ser Val Arg Leu Ala Arg Glu Pro Leu Phe Arg Ala Ile			
305	310	315	320
tgc agc aat agc ttc aga tgc tcc ctc agc cag ata ctt aga aca tct			1008
Cys Ser Asn Ser Phe Arg Cys Ser Leu Ser Gln Ile Leu Arg Thr Ser			
325	330	335	
caa ttc tat acc tcc atc act gcc gtt ggt ttt agg aat ctt aat aat			1056
Gln Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Ala Val Gly Phe Arg Asn Leu Asn Asn			
340	345	350	
cgg ttg gac ttc act ttc att ttt cag ttc gat gaa gct tcc ttt			1101
Arg Leu Asp Phe Thr Phe Ile Phe Gln Phe Asp Glu Ala Ser Phe			
355	360	365	
tgaaaagagc acaca atg ata gaa atc aat gac ctc aag aaa tct ttt ggc			1152
Met Ile Glu Ile Asn Asp Leu Lys Lys Ser Phe Gly			
1	5	10	
gtt cgg atc tta tgg caa ggt ctc agt cat aag ttt tta cca gga aca			1200
Val Arg Ile Leu Trp Gln Gly Leu Ser His Lys Phe Leu Pro Gly Thr			
15	20	25	
atg aca gca ctg act gga gcg tcc ggt tca gga aaa tcg act ttg ctc			1248
Met Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu			
30	35	40	
aac tgt ctt ggc aca ctt gac aaa cca agt tcc gga cag atc ctt gtc			1296
<del>Asn Cys Leu Gly Thr Leu Asp Lys Pro Ser Ser Gly Gln Ile Leu Val</del>			
45	50	55	60
gag gat gta gac ctt ctg aaa ctc tct acg cgt aag caa cgg tta tac			1344
Glu Asp Val Asp Leu Leu Lys Leu Ser Thr Arg Lys Gln Arg Leu Tyr			
65	70	75	
agg aaa aat acg gtg ggc tat tta ttt caa gat tat gcc ttg att ccc			1392

8/14

Arg	Lys	Asn	Thr	Val	Gly	Tyr	Leu	Phe	Gln	Asp	Tyr	Ala	Leu	Ile	Pro	
			80					85					90			
gac	agg	aca	gtt	aaa	ttc	aac	ctt	cag	ctt	gcg	gtg	gaa	aaa	cac	aaa	1440
Asp	Arg	Thr	Val	Lys	Phe	Asn	Leu	Gln	Leu	Ala	Val	Glu	Lys	His	Lys	
			95				100					105				
tgg	cct	gaa	att	cct	caa	gta	ctt	cat	gct	gtt	ggc	ctt	gag	tcg	ttc	1488
Trp	Pro	Glu	Ile	Pro	Gln	Val	Leu	His	Ala	Val	Gly	Leu	Glu	Ser	Phe	
			110				115				120					
gag	gaa	aag	cca	gtt	ttt	gaa	ctc	tct	ggc	ggc	gaa	caa	caa	cga	act	1536
Glu	Glu	Lys	Pro	Val	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly	Gly	Glu	Gln	Gln	Arg	Thr	
			125				130				135			140		
gcg	ttg	gcc	cgg	gta	ctg	ctc	aaa	aat	ccc	cga	ata	att	ctg	gct	gat	1584
Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Pro	Arg	Ile	Ile	Leu	Ala	Asp	
			145					150					155			
gaa	cca	acc	gga	gct	cta	gat	tta	aca	aac	agt	gag	cta	gtc	ata	gaa	1632
Glu	Pro	Thr	Gly	Ala	Leu	Asp	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu	Leu	Val	Ile	Glu	
			160					165					170			
gca	ttg	aga	gca	ctc	gcc	gac	aaa	ggc	gcc	acc	gtt	gtt	gtt	gct	acg	1680
Ala	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Lys	Gly	Ala	Thr	Val	Val	Val	Ala	Thr	
			175				180						185			
cac	tcg	ccc	ctc	ttc	cga	gaa	tca	gcg	gat	acc	att	atc	aaa	cta		1725
His	Ser	Pro	Leu	Phe	Arg	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Ile	Ile	Lys	Leu		
			190				195						200			
<del>taggtgcccc aacttttcgg agatctcagt gca atg atg gaa ttc tta aac act</del>																<del>1779</del>
Met Met Glu Phe Leu Asn Thr																
							1						5			
cac	cgt	ttg	att	gtt	ctc	ggg	agt	ttg	tct	ttt	cta	ggg	cta	ggt	ttc	1827
His	Arg	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	
			10				15						20			

9/14

gcg gaa gtc ctg ctg cgt ggc cag tgg tca aca ccg cag ttt ttt gtt	1875
Ala Glu Val Leu Leu Arg Gly Gln Trp Ser Thr Pro Gln Phe Phe Val	
25 30 35	
ttc act ttc ttg caa act ctg ctt ctc gta ttg tgt ttt att cct aaa	1923
Phe Thr Phe Leu Gln Thr Leu Leu Leu Val Leu Cys Phe Ile Pro Lys	
40 45 50 55	
ctc tcg gtt cct ttt gtg gtg ctt cta agc att gcc caa ctc gcg ctt	1971
Leu Ser Val Pro Phe Val Val Leu Leu Ser Ile Ala Gln Leu Ala Leu	
60 65 70	
gca tac ctg tgt att cat ggt gaa cct caa agc acc agc cct ttc act	2019
Ala Tyr Leu Cys Ile His Gly Glu Pro Gln Ser Thr Ser Pro Phe Thr	
75 80 85	
tta att gtt gcc caa atg gcg ttt tcg gga ttg ctc atg ttc aga ggg	2067
Leu Ile Val Ala Gln Met Ala Phe Ser Gly Leu Leu Met Phe Arg Gly	
90 95 100	
caa cgg gtg ctc gct ttt atc tct gca ggt ggg ctc att tgg att ggg	2115
Gln Arg Val Leu Ala Phe Ile Ser Ala Gly Gly Leu Ile Trp Ile Gly	
105 110 115	
acc atc gat cca aca aac ggt gct tgg tct cct cat gtg atg tcc gcg	2163
Thr Ile Asp Pro Thr Asn Gly Ala Trp Ser Pro His Val Met Ser Ala	
120 125 130 135	
cta gca ctt gcc gta ttc ttt gcg ctg tcg atg gca ctt gga cag gtt	2211
Leu Ala Leu Ala Val Phe Phe Ala Leu Ser Met Ala Leu Gly Gln Val	
140 145 150	
ctt cga tca aaa gtt gaa caa aga gcc aac ctt gag gag cag gca aaa	2259
Leu Arg Ser Lys Val Glu Gln Arg Ala Asn Leu Glu Glu Gln Ala Lys	
155 160 165	
att cag aca gaa ctg cgc aga aaa gaa cta agc act cca tct gca tcg	2307
Ile Gln Thr Glu Leu Arg Arg Lys Glu Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser	



10/14

170	175	180	
gtc ggt tgc caa aga act tac gtt tgc agt gat gaa atc gca gga gct			2355
Val Gly Cys Gln Arg Thr Tyr Val Cys Ser Asp Glu Ile Ala Gly Ala			
185	190	195	
cag tgg tcg cga taa			2370
Gln Trp Ser Arg			
200			

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 367

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;400&gt; 8

Met Leu Ala Thr Arg Leu Ile Thr Leu Phe Phe Phe Leu Gly Ile Ile			
1	5	10	15
Gly Ser Leu Thr Gly Asn Leu Ser Glu Leu Arg Ala Gln Thr Thr Phe			
20	25	30	
Ser Thr Leu Trp Asp Thr His Lys Glu Thr Tyr Arg Val Ser Ile Ala			
35	40	45	
Ser Ala Ala Gly Gln Asp Phe Tyr Gly Leu Ala Glu Thr Leu Arg Thr			
50	55	60	
Met Asp Arg His Gly Glu Ile Ile Leu Ala Asp Arg Gln Trp Leu Thr			
65	70	75	80
Ala Pro Leu Asp Ile Gly Ala Pro Val Val Leu Ser Asn Thr Thr Phe			
85	90	95	
Ala Val Asp Glu Gly Leu Leu Ala Pro Lys Asp Leu Pro Gln Ser Asp			
100	105	110	
Glu Ile Thr Ile Leu His Pro Gln Phe Leu Asp Ser Ala Lys Glu Pro			

11/14

115	120	125
Glu Leu Leu Gly Leu Leu Glu Phe Glu Ala Ser Asn Ser Gln Val Pro		
130	135	140
Met Pro Lys Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Asp Ser Glu Asp Ser Thr Asn		
145	150	155
Pro Met Ser Glu Val Phe Thr Tyr Asn Ile Asn Leu Asp Ser Ala Val		
165	170	175
Arg Asn Pro Ile Val Val Ile Leu Pro Ala Gly Leu Glu Leu Leu Ser		
180	185	190
Asp Gln Asn Leu Ser Ala Arg Leu Thr Gln Asn Ser Leu Leu Ile Lys		
195	200	205
Asp Gln Thr Gly Val Asn Ala Leu Leu Ser Ser Glu Asp Ser Arg Asn		
210	215	220
Tyr Val Gly Ala Ala Ser Pro Met Ile Asp Thr Trp Glu Glu Ser Val		
225	230	235
Val Arg Leu Lys Glu Ala Asn Gln Ile Ile Ala Phe Asn Ala Phe Ile		
245	250	255
Ala Leu Phe Leu Thr Thr Thr Leu Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly Ile		
260	265	270
Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys Thr Met Gly Ser Ala Ser Thr Arg Lys		
275	280	285
Ser Ser Ile Lys Ser Ser Ile Thr Ala Ala Asn Cys Arg Ser Asn Phe		
290	295	300
<del>Arg Phe Asn Ser Val Arg Leu Ala Arg Glu Pro Leu Phe Arg Ala Ile</del>		
305	310	315
Cys Ser Asn Ser Phe Arg Cys Ser Leu Ser Gln Ile Leu Arg Thr Ser		
325	330	335
Gln Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Ala Val Gly Phe Arg Asn Leu Asn Asn		
340	345	350

12/14

Arg Leu Asp Phe Thr Phe Ile Phe Gln Phe Asp Glu Ala Ser Phe

355

360

365

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 203

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;400&gt; 9

Met Ile Glu Ile Asn Asp Leu Lys Lys Ser Phe Gly Val Arg Ile Leu

1

5

10

15

Trp Gln Gly Leu Ser His Lys Phe Leu Pro Gly Thr Met Thr Ala Leu

20

25

30

Thr Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Asn Cys Leu Gly

35

40

45

Thr Leu Asp Lys Pro Ser Ser Gly Gln Ile Leu Val Glu Asp Val Asp

50

55

60

Leu Leu Lys Leu Ser Thr Arg Lys Gln Arg Leu Tyr Arg Lys Asn Thr

65

70

75

80

Val Gly Tyr Leu Phe Gln Asp Tyr Ala Leu Ile Pro Asp Arg Thr Val

85

90

95

Lys Phe Asn Leu Gln Leu Ala Val Glu Lys His Lys Trp Pro Glu Ile

100

105

110

~~Pro Gln Val Leu His Ala Val Gly Leu Glu Ser Phe Glu Glu Lys Pro~~

115

120

125

Val Phe Glu Leu Ser Gly Gly Glu Gln Gln Arg Thr Ala Leu Ala Arg

130

135

140

Val Leu Leu Lys Asn Pro Arg Ile Ile Leu Ala Asp Glu Pro Thr Gly

145

150

155

160

13/14

Ala Leu Asp Leu Thr Asn Ser Glu Leu Val Ile Glu Ala Leu Arg Ala  
                   165                  170                  175  
 Leu Ala Asp Lys Gly Ala Thr Val Val Val Ala Thr His Ser Pro Leu  
                   180                  185                  190  
 Phe Arg Glu Ser Ala Asp Thr Ile Ile Lys Leu  
                   195                  200

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 203

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;400&gt; 10

Met Met Glu Phe Leu Asn Thr His Arg Leu Ile Val Leu Gly Ser Leu  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Phe Leu Gly Leu Gly Phe Ala Glu Val Leu Leu Arg Gly Gln Trp  
                   20                  25                  30  
 Ser Thr Pro Gln Phe Phe Val Phe Thr Phe Leu Gln Thr Leu Leu Leu  
                   35                  40                  45  
 Val Leu Cys Phe Ile Pro Lys Leu Ser Val Pro Phe Val Val Leu Leu  
                   50                  55                  60  
 Ser Ile Ala Gln Leu Ala Leu Ala Tyr Leu Cys Ile His Gly Glu Pro  
   65                  70                  75                  80  
~~Gln Ser Thr Ser Pro Phe Thr Leu Ile Val Ala Gln Met Ala Phe Ser~~  
                   85                  90                  95  
 Gly Leu Leu Met Phe Arg Gly Gln Arg Val Leu Ala Phe Ile Ser Ala  
                   100                  105                  110  
 Gly Gly Leu Ile Trp Ile Gly Thr Ile Asp Pro Thr Asn Gly Ala Trp  
                   115                  120                  125

14/14

Ser Pro His Val Met Ser Ala Leu Ala Leu Ala Val Phe Phe Ala Leu  
130 135 140

Ser Met Ala Leu Gly Gln Val Leu Arg Ser Lys Val Glu Gln Arg Ala  
145 150 155 160

Asn Leu Glu Glu Gln Ala Lys Ile Gln Thr Glu Leu Arg Arg Lys Glu  
165 170 175

Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser Val Gly Cys Gln Arg Thr Tyr Val Cys  
180 185 190

Ser Asp Glu Ile Ala Gly Ala Gln Trp Ser Arg  
195 200

---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07079

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/55, C12N9/16, C07K14/345

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nucleic Acids Research, Vol.22, No.24, (1996), Ralf Himmelreich, et al. "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae", p.4420-4449, especially, see p.4428-29 and p.45-47	1-14
A	Archives of Microbiology, Vol.165, No. 5, (1996), Norbert Peekhaus et al. "The gluEMP operon from Zymomonas mobilis encodes a high-affinity glutamate carrier with similarity to binding-protein-dependent transport systems", p.325-332	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
19 January, 2000 (19.01.00)


Date of mailing of the international search report  
01 February, 2000 (01.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/31、C12N15/55、C12N9/16、C07K14/345		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/31、C12N15/55、C12N9/16、C07K14/345		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nucleic Acids Research, 第22巻, 第24号, (1996), Ralf Himmelreich, et al. "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ", p. 4420-4449 特に p. 4428-29, 45-47参照	1-14
A	Archives of Microbiology, 第165巻, 第5号, (1996), Norbert Peekhaus et al. "The <i>gluEMP</i> operon from <i>Zymomonas mobilis</i> encodes a high-affinity glutamate carrier with similarity to binding-protein-dependent transport systems", p. 325-332	1-14
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19.01.00	国際調査報告の発送日 01.02.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936 

JUN 20 2002

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

TECH CENTER 1600/2900

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference B-528SMOP924	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/07079	International filing date (day/month/year) 16 December 1999 (16.12.99)	Priority date (day/month/year) 18 December 1998 (18.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/31, 15/55, 9/16, C07K 14/345		
Applicant AJINOMOTO CO., INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 May 2000 (25.05.00)	Date of completion of this report 10 January 2001 (10.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/07079

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/07079

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### Claims 1-14

The subject matters of claims 1-14 appear to be novel and to involve an inventive step in view of the documents cited in the ISR.

Particularly the proteins constituting the ABC transporter having specific amino acid sequences and genes encoding the proteins described in claims 1-14 are not described in any of the documents cited in the ISR. It cannot be considered to be easy either, to acquire the proteins and genes.